

25 JUN 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP02/13354

20.12.02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 7月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-212348

[ST.10/C]:

[JP2002-212348]

出 願 人

Applicant(s):

ヤマサ醤油株式会社

REC'D 21 FEB 2003

WIPO

FOY

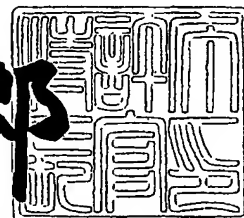
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3004219

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 YP2002-014
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
【発明者】

【住所又は居所】 千葉県山武郡成東町津辺 3 0 - 2

【氏名】 奥山 潔

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県銚子市栄町 2 - 1 - 1 2

【氏名】 野口 利忠

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県銚子市春日町 3 0 9 1 - 3

【氏名】 渋谷 進

【特許出願人】

【識別番号】 000006770

【住所又は居所】 千葉県銚子市新生町 2 丁目 1 0 番地の 1

【氏名又は名称】 ヤマサ醤油株式会社

【代表者】 濱口 道雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056030

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

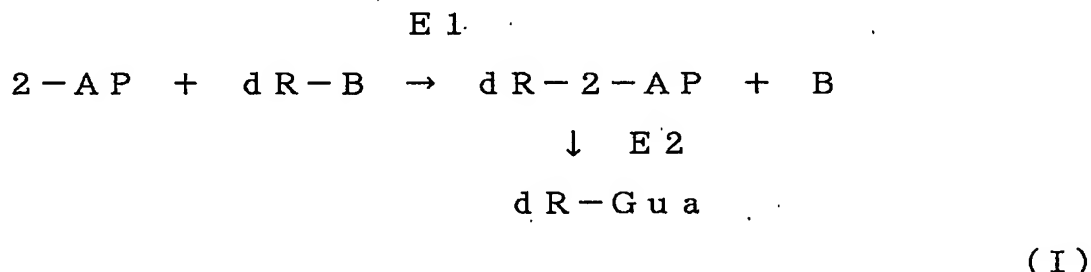
【書類名】 明細書

【発明の名称】 2' - デオキシグアノシンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ（E 1）と加水分解酵素（E 2）とを併用し、下記反応式（I）により2-アミノ-6-置換プリン（2-AP）と2'-デオキシヌクレオシド（dR-B）から2'-デオキシグアノシン（dR-Gua）を合成することを特徴とする2'-デオキシグアノシンの製造法。

【式1】



（式中、2APは2-アミノ-6-置換プリン、dRは2-デオキシリボース、Guaはグアニン、Bは核酸塩基、E1はヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ、E2は加水分解酵素を示す。）

【請求項2】 ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとしてヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼIIを、加水分解酵素としてアデノシンデアミナーゼを使用する、請求項1記載の製造法。

【請求項3】 2-アミノ-6-置換プリンにおける置換基が、加水分解可能な基である、請求項1記載の製造法。

【請求項4】 2-アミノ-6-置換プリンが、2-アミノ-6-ハロゲンプリンである、請求項1記載の製造法。

【請求項5】 2-アミノ-6-置換プリンが、2-アミノ-6-クロロプリンである、請求項1記載の製造法。

【請求項6】 2-アミノ-6-置換プリンが、2, 6-ジアミノプリンである、請求項1記載の製造法。

【請求項7】 2'-デオキシヌクレオシドが、2'-デオキシピリミジンヌ

クレオシドである、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 8】 2' - デオキシヌクレオシドがチミジンである、請求項 1 記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素とを併用（カップリング）した 2' - デオキシグアノシンの製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

2' - デオキシヌクレオシド類は、アンチセンス医薬品（2' - デオキシヌクレオチドのオリゴマーなど）を初めとする種々の医薬品の原料などに有用な化合物である。

【0003】

従来、これらの 2' - デオキシヌクレオシド類は、化学的に合成するか、白子などの DNA を酵素分解することにより調製されていたが、化学的合成法では製造コストが高く、また DNA 分解法では生成する 4 種ある 2' - デオキシヌクレオシドの種別の需要と供給のバランスが取れず、効率的ではないという問題があった。

【0004】

そのため、最近、ヌクレオシド・ホスホリラーゼやヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いた 2' - デオキシヌクレオシド類の合成法が開発されている。

【0005】

上記酵素法は、化学的に容易に合成可能な 2' - デオキシウリジンあるいはチミジンを 2 - デオキシリボースの供与体とし、化学的に合成可能な核酸塩基もしくはリボヌクレオシドを添加することで、酵素の糖転移反応により目的とする 2' - デオキシヌクレオシドを合成しようとするものである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、4種の2'-デオキシヌクレオシドの中で、塩基であるグアニンの難溶性に起因して、2'-デオキシグアノシンだけがその効率的な製造法が確立されていないのが現状である。この問題を解決するため、最近いくつかの報告がなされている。

【0007】

(1) 方法1；微生物を酵素源として、2'-デオキシウリジンあるいはチミジンとグアニンを基質として2'-デオキシグアノシンを合成する方法（特開平11-137290）

しかしながら、この方法では、1 g/L (3.6 mM) 程度の2'-デオキシグアノシンしか合成することができない。さらに、グアニンの代りにグアノシンあるいはグアニル酸を基質にしたとしても、2'-デオキシグアノシンの生成量はせいぜい6.3~7.3 g/L (22.8~26.4 mM) 程度である。

さらにこの方法では、大量の培養菌体を必要としたり、反応中グアノシンと2'-デオキシグアノシンを分離精製しなければならないという問題点もある。しかし、グアノシンと2'-デオキシグアノシンはその物性がほぼ同一であることから、グアノシンと2'-デオキシグアノシンの混合物より2'-デオキシグアノシンのみを単離精製することはほとんど不可能である。

【0008】

(2) 方法2；菌体由来の酵素としてヌクレオシドホスホリラーゼを用いて、2'-デオキシウリジンあるいはチミジンとジアミノプリンを基質としてジアミノプリン2'-デオキシリボシドを合成し、これにアデノシンデアミナーゼを作用させて2'-デオキシグアノシンを合成する方法（特開平11-137289、US 6197552）

この方法は、溶解性の高いジアミノプリンを基質とすることで、上記方法1の欠点を改善するものであるが、菌体由来の酵素としてヌクレオシドホスホリラーゼを用いていることから、逆反応による生成物の分解と加リン酸分解反応による収率の低下は避けられず、必ずしも実用的な方法とは言えない。

【0009】

(3) 方法3 ; チミジンを2-デオキシリボース供与体としてグアニンとのヌクレオシドホスホリラーゼ反応による2'-デオキシグアノシンを合成する系において、生成するチミンを酵素分解して反応平衡を2'-デオキシグアノシン合成に傾けるという方法 (特開平11-46790、US6017736)

この方法により12~15 mM程度の2'-デオキシグアノシンを合成できることが報告されているが、ウラシルチミンデヒドロゲナーゼなどの特殊な酵素を必要とし、必ずしも汎用性の高い方法とは言えない。

【0010】

(4) 方法4 ; 2-デオキシリボース1-リン酸とグアニンを基質とし、ヌクレオシドホスホリラーゼを触媒とした2'-デオキシグアノシンの合成系に塩化カルシウム添加して合成効率を高める方法 (特開2001-26599、WO00/70074)

しかしこの方法は、2-デオキシリボース1-リンの入手が困難であり、収率8 mM程度であり、実用に耐え得る方法ではない。

【0011】

(5) 方法5 ; 2-デオキシリボース1-リン酸とグリオキサールグアニンを基質とし、ヌクレオシドホスホリラーゼを触媒としたグリオキサールデオキシグアノシンを生成し、これをアルカリ分解して2'-デオキシグアノシンを合成する方法 (特開2001-269192、EP1138775)

この方法は、2-デオキシリボース1-リンの入手が困難であり、またどの程度の収率で2'-デオキシグアノシンが得られるかは明確に開示されていない。

【0012】

さらに、本発明者らは前述のヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼの触媒によりグアニンとチミジンあるいは2'-デオキシウリジンを基質とした2'-デオキシグアノシンの合成を報告したが、前述の従来技術と同様、グアニンの難溶性のため、収率よく2'-デオキシグアノシンを合成することはできなかった (特開2001-46097)。

このように、2'-デオキシグアノシンの酵素合成に関しては、種々検討され

ているものの、未だに実用的な方法が提案されていないのが実状である。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、グアニンの代わりに2-アミノ-6-置換プリンと2'-デオキシヌクレオシドを用い、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素とを組み合わせることで、2'-デオキシグアノシンの合成を効率よく行わせることが可能であることを見出した。

【0014】

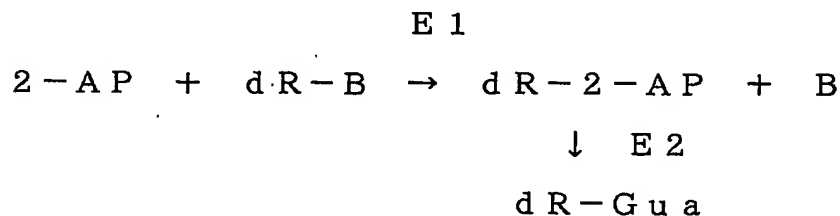
従来、ヌクレオシドホスホリラーゼとアデノシンデアミナーゼとの組み合わせによるデオキシヌクレオシド化合物の合成は種々報告されているものの（特開平11-137289、US6197552、特許3033918など）、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素とを組み合わせでデオキシヌクレオシド化合物を合成することに関する報告はない。

本発明者らは、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いた反応の方が、ヌクレオシド・ホスホリラーゼを用いた反応より反応効率が高いことを確認し、さらに加水分解酵素と組み合わせることにより、2'-デオキシグアノシンを効率よく合成できることを確認し、本発明を完成させた。

【0015】

したがって、本発明は、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ（E1）と加水分解酵素（E2）とを併用し、下記反応式（I）により2-アミノ-6-置換プリン（2-AP）と2'-デオキシヌクレオシド（dR-B）から2'-デオキシグアノシン（dR-Gua）を合成することを特徴とする2'-デオキシグアノシンの製造法に関するものである。

【式2】



（I）

(式中、2APは2-アミノ-6-置換プリン、dRは2-デオキシリボース、Guaはグアニン、Bは核酸塩基、E1はヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ、E2は加水分解酵素を示す。)

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明は、上記式(I)に示す反応により2'-デオキシグアノシンを製造しようとするものである。

反応に使用するヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとしては、2-デオキシリボシル基を転移できる活性を有するものであれば特に限定されず、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼI、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼIIなどを例示することができ、特にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼIIが好適である。また、加水分解酵素としては、2-アミノ-6-置換プリン又はそれを有するヌクレオシドの6位の置換基を加水分解して2-アミノ-6-オキソプリン(グアニン)又はそれを有するヌクレオシドを生成できる活性を有するものであれば特に限定されず、アデノシンデアミナーゼ、アデニンデアミナーゼ、AMPデアミナーゼ、ADPデアミナーゼなどを例示することができ、特にアデノシンデアミナーゼが好適である。

【0017】

このような酵素は、いずれも公知の酵素であり、動物由来、植物由来、微生物由来など特定のものに限定されず、すべての由来のものを使用することができ、酵素調製の簡便性などの点から微生物由来の酵素を使用するのが好都合である。

たとえば、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼは乳酸菌に属する微生物から容易に調製でき、アデノシン・デアミナーゼは細菌や酵母に属する微生物から容易に調製することができる(Methods in Enzymology, Vol. LI, 446 (1978)、J. Am. Chem. Soc., 79, 630-633 (1957)、J. Biol. Chem., 242, 740-746 (1967) 等参照)。

【0018】

微生物を培養するための培地としては、これらの微生物が資化可能な炭素源及

び窒素源を適当量含有し、必要に応じて金属塩、微量発育促進物質、消泡剤などを添加したものが使用される。具体的には、培地成分としては糖類（グルコース、サッカロースなど）、天然炭水化物（糖蜜、廃糖蜜、澱粉、麦、ふすま、米など）、アルコール類、脂肪酸類、炭化水素類など、窒素源としては、肉エキス、酵母エキス、大豆加水分解物など、金属塩としては亜鉛、鉄、マグネシウムなどのリン酸塩、塩酸塩、硫酸塩など、微量発育促進物質としては、ビタミンB1、ビタミンB2、ビオチンなどがあげられる。

【0019】

培養は、通常の液体培養法（振とう培養、通気攪拌培養、静置培養、連続培養など）あるいは固体培養法によって、20～50℃の温度条件下で必要により通気攪拌しながら、目的とする酵素活性が十分得られるまで行えばよい。

このようにして得られた培養物を用い、使用目的に応じ適宜処理加工したものを酵素調製物として本発明に使用する。そのような酵素調製物としては特に制限されるものではなく、例えば、微生物の培養物自体、培養物から通常の分離手段（遠心分離、沈殿分離、凝集分離、洗浄、水抽出など）によって分離された菌体、またはその菌体処理物あるいは酵素抽出物を例示することができる。

【0020】

菌体処理物をさらに具体的に例示すれば、生菌体を適当な緩衝液に懸濁し、超音波処理、フレンチプレス処理などにより物理的に菌体を破碎するか、あるいはリゾチーム処理など酵素的に溶菌させた後、菌体残渣を遠心分離により除去した無細胞抽出液を挙げることができる。

さらに、この無細胞抽出液あるいは前記の酵素抽出物を熱処理、硫酸塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種クロマトグラフィー処理などの酵素精製に通常使用されている処理を単独で、または数種組み合わせて得られる粗精製酵素、精製酵素を例示することもできる。

【0021】

さらに、上記酵素の遺伝子がクローニングされている場合には、クローン化されたDNA断片を用い、公知の組換えDNA手法で目的とする酵素を調製することも可能である。すなわち、遺伝子のクローニング、クローン化したDNA断片

を用いた発現ベクターの調製、当該発現ベクターを用いた目的とする酵素活性を有する酵素の調製などは、分子生物学の分野に属する技術者にとっては周知の技術であり、例えば「Molecular Cloning」(Maniatis ら編、Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York(1982)) に記載の方法に従って行うことができる。

【0022】

なお、乳酸菌のヌクレオシドデオキシリボシルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングと発現に関しては文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2234-2245 (2000)) に記載されており、また大腸菌のアデノシン・デアミナーゼ遺伝子のクローニングと発現に関しても文献 (公開平 5 - 2 1 9 9 7 8) に記載されている。

【0023】

次に、反応に使用する 2' -デオキシヌクレオシドとしては、2' -デオキシアデノシン、2' -デオキシシチジン、2' -デオキシウリジン、チミジン等を使用することができ、特に 2' -デオキシピリミジンヌクレオシド、さらに好ましくはチミジンが好適である。

【0024】

また、2-アミノ-6-置換プリンとしては、2-アミノ-6-置換プリンにおける置換基が加水分解可能な基であるプリン誘導体であれば使用することができ、具体的には 2-アミノ-6-ハロゲンプリン (好ましくは、2-アミノ-6-クロロプリン) 及び 2, 6-ジアミノプリンを挙げることができる。

【0025】

2' -デオキシグアノシンの合成反応は、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼによる反応と加水分解酵素による反応の 2 つの反応工程からなり、2 つの反応を順次行っても良く、同時並行的に行ってもかまわない。

すなわち、10 mM 以上、好ましくは 20 mM 以上、さらに好ましくは 50 ~ 500 mM 濃度になるように適当な 2' -デオキシヌクレオシドと 10 mM 以上、好ましくは 20 mM 以上の 2-アミノ-6-置換プリンとを水または緩衝液に溶解または懸濁させ、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用

いて 2-アミノ-6-置換プリン-2'-デオキシリボシドを調製し、この中間体を単離し、または単離することなく加水分解酵素（たとえば、アデノシン・デアミナーゼ）を水性媒体中で作用させることで、目的とする 2'-デオキシグアノシンを製造することができる。

【0026】

上記反応は、0.001 ユニット/ml 以上、好ましくは 0.01 ユニット/ml 以上のヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ、及び 2.4 ユニット/ml 以上、好ましくは 24 ユニット/ml 以上のアデノシン・デアミナーゼを使用し、pH 3~10、好ましくは 5~9、温度 10~60℃、好ましくは 20~50℃の条件下で 10 分~50 時間程度、必要により攪拌しながら実施することが好ましい。

反応温度が 10℃未満のときは反応速度が遅く、反応効率が悪い。一方、反応温度が 60℃を越える場合には酵素が変性、失活する可能性があり、好ましくない。また、反応途中で pH が変動するので、酸またはアルカリを用いて上記 pH 範囲に補正すればよい。

【0027】

上記反応において、2-アミノ-6-置換プリン-2'-デオキシリボシドを反応液から単離することなく加水分解酵素を作用させる場合には、一旦加熱処理やアルカリ処理などを施してヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを失活させた後、加水分解酵素を作用させるのが好ましい。

【0028】

反応終了後、生成した 2'-デオキシグアノシンは核酸関連物質の精製法として通常使用されている方法あるいはこれを応用した方法によって分離精製することができる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過法など各種のクロマトグラフィー、向流分配、向流抽出など二液相間の分配を利用する方法、濃縮、冷却、有機溶媒添加など溶解度の差を利用する方法などの 2'-デオキシヌクレオシドの分離精製で使われている一般的な分離精製法を単独で、あるいは適宜組み合わせればよい。

【 0 0 2 9 】

【発明の効果】

上述したように、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼと加水分解酵素を併用（カップリング）する本発明は、2' -デオキシグアノシンを効率的に合成することができるため、実用的かつ効率的な2' -デオキシグアノシンの製造法である。

【 0 0 3 0 】

【実施例】

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らかである。

なお、実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4 DNAリガーゼによるDNA連結、並びに大腸菌の形質転換法は全て「Molecular Cloning」（前述）にしたがって行った。また、各種制限酵素、T4 DNAリガーゼは全て宝酒造（株）より入手した。

【 0 0 3 1 】

また、酵素活性の測定と単位の算出は以下の方法で行った。

<ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの活性の測定>

5 mMのチミジンとシトシンを含有する20 mMのMOPS-NaOH緩衝液（pH 6.0）に酵素標品を加えて40℃に保温し、反応終了後、1分間煮沸することにより酵素を失活させた。2' -デオキシシチジンの生成量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、40℃で1分間に1 μ molの2' -デオキシシチジンを生成する活性を1単位（ユニット）とした。

【 0 0 3 2 】

<プリン・ヌクレオシド・ホスホリラーゼおよびピリミジン・ヌクレオシドホスホリラーゼの活性の測定>

特開平4-4882（特許2948265号）に記載の方法に従い、70℃または50℃におけるイノシンおよびウリジンの加リン酸分解活性を測定した。

【 0 0 3 3 】

<アデノシン・デアミナーゼの活性の測定>

アデノシンを含む反応液 5 ml (50 mM トリス塩酸 (pH 8.2), 30 mM アデノシン) をあらかじめ 37℃ に加温しておき、無細胞抽出液を 5 μ l 添加して、37℃ で 5 分間反応させた後、0.2 ml 採取して、等量の 0.1 N NaOH と混合させることにより酵素を失活させる。この溶液を 166 倍希釈後、イノシンの生成量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、37℃ で 1 分間に 1 μ mol のイノシンを生成する活性を 1 単位 (ユニット) とした。

【0034】

実施例 1

(1) ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ II の調製

ペプトン 20 g/L、酵母エキス 10 g/L、NaCl 5 g/L、グルコース 1 g/L、100 μ g/ml のアンピシリンを含有する栄養培地 100 ml に、特開 2002-17393 号記載の方法に従い調製した組換えベクター pTrc-T2F4 を保持する大腸菌形質転換体 JM109 [pTrc-T2F4] を植菌し、37℃ で振盪培養した。

4×10^8 個/ml に達した時点で、培養液に終濃度 0.1 mM となるように IPTG を添加し、さらに 37℃ で 16 時間振盪培養を続けた。培養終了後、遠心分離 (9,000 g、10 分間) により培養菌体を回収し、10 ml の蒸留水に懸濁した。菌体懸濁液を超音波破碎機にて処理して、さらに遠心分離 (12,000 g、10 分間) により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を無細胞抽出液とした。

【0035】

(2) プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼの調製

ペプトン 20 g/L、酵母エキス 10 g/L、NaCl 5 g/L、グルコース 1 g/L、100 μ g/ml のアンピシリンを含有する栄養培地 100 ml に、特開平 9-117298 号 (特許 2999954 号) 記載の方法に従い調製した組換えベクター pTrc-B56 を保持する大腸菌 JM109 [pTrc-B56] を植菌し、37℃ で振盪培養した。

4×10^8 個/ml に達した時点で、培養液に終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、さらに 37℃ で 5 時間振盪培養を続けた。培養終了後、遠心分離

(9,000 g、10分間)により培養菌体を回収し、20 mlの緩衝液(50 mM、トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)、5 mM EDTA、0.1% Triton X100含有)に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度1 mg/mlとなるようにリゾチームを加え、37℃で1時間保温することで形質転換体を溶菌させ、さらに遠心分離(12,000 g、10分間)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を無細胞抽出液とした。

【0036】

(3) プリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼの調製

ペプトン20 g/L、酵母エキス10 g/L、NaCl 5 g/L、グルコース 1 g/L、100 µg/mlのアンプシリンを含有する栄養培地100 mlに、特開平6-253854号記載の方法に従い調製した組換えベクターpTrc-pynを保持する大腸菌JM109[pTrc-pyn]を植菌し、37℃で振盪培養した。

4×10^8 個/mlに達した時点で、培養液に終濃度0.1 mMとなるようにIPTGを添加し、さらに37℃で16時間振盪培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9,000 g、10分間)により培養菌体を回収し、20 mlの緩衝液(50 mM、トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)、5 mM EDTA、0.1% Triton X100含有)に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度1 mg/mlとなるようにリゾチームを加え、37℃で1時間保温することで形質転換体を溶菌させ、さらに遠心分離(12,000 g、10分間)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を無細胞抽出液とした。

【0037】

(4) アデノシン・デアミナーゼの調製

ペプトン20 g/L、酵母エキス10 g/L、NaCl 5 g/L、グルコース 1 g/L、100 µg/mlのアンプシリンを含有する栄養培地100 mLに、特開平5-219978号に記載の方法に従い調製した組換えベクターpDR-addを保持する大腸菌形質転換体JM105[pDR-add]を植菌し、37℃で振盪培養した。

4×10^8 個/mlに達した時点で、培養液に終濃度0.1 mMとなるように

IPTGを添加し、さらに37℃で3時間振盪培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9,000g、10分間)により培養菌体を回収し、10mlの緩衝液(20mMトリス塩酸(pH8.2)、10%エチレングリコール)に懸濁した。菌体懸濁液を超音波破碎機にて処理して、さらに遠心分離(2,000g、10分間)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を無細胞抽出液とした。

【0038】

(5) 2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドの合成における酵素の比較

100mM チミジン(ヤマサ醤油)、50mM 2-アミノ-6-クロロプリン(シグマ)、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ-II 0.385ユニット/ml、またはプリン・ヌクレオシドホスホリラーゼ-II 0.77 ユニット/mlおよびピリミジン・ヌクレオシドホスホリラーゼ 0.385ユニット/mlを含む溶液5mlを40℃または50℃で攪拌しながら16時間反応させた。反応結果は下表に示す。

この表から明らかなように、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いた方が、効率よく2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドを合成することができる。なお、モル収率とは、2-アミノ-6-クロロプリンが2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドの合成に利用された率を示す。

【0039】

【表1】

酵素名	合成された2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシド	モル収率(%)
ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ-II	46.4mM	92.8
プリン・ヌクレオシドホスホリラーゼ-IIおよびピリミジン・ヌクレオシドホスホリラーゼ	39.1mM	78.1

【0040】

(6) 2'-デオキシグアノシンの合成

上記(5)のヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼⅡを用いて得られた反応液1mlに20%水酸化ナトリウムを10 μ l加えたのち、0.1mlの1M トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)を加えたのち、アデノシン・デアミナーゼ 50ユニット/mlを添加して40℃で攪拌しながら13時間反応させた。

その結果、43.2 mMの2-アミノ-6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドから42.0 mMの2'-デオキシグアノシンが合成されていた(モル収率97.2%)。

【0041】

実施例2

(1) 2, 6-ジアミノプリン-2'-デオキシリボシドの合成

100 mM チミジン(ヤマサ醤油)、50 mM 2, 6-ジアミノプリン(シグマ)、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼⅡ 0.385ユニット/mlを含む溶液5mlを40℃で攪拌しながら16時間反応させた。この結果、48.2 mMの2, 6-ジアミノプリン-2'-デオキシリボシドが合成された。

【0042】

(2) 2'-デオキシグアノシンの合成

上記(1)で得られた反応液1mlに20%水酸化ナトリウムを10 μ l加えたのち、0.1mlの1M トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)を加えたのち、アデノシン・デアミナーゼ 50ユニット/mlを添加して40℃で攪拌しながら13時間反応させた。

その結果、43.9 mMの2, 6-ジアミノプリン-2'-デオキシリボシドから41.2 mMの2'-デオキシグアノシンが合成されていた(モル収率93.8%)。

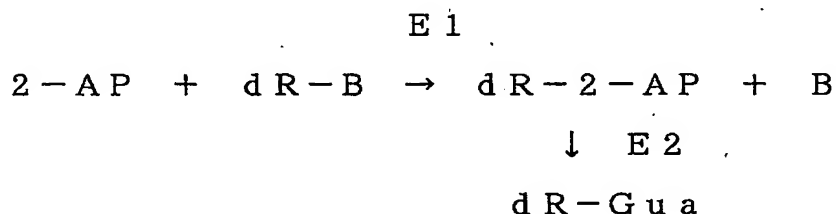
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 実用的かつ効率的な 2' -デオキシグアノシンの製造法を提供する。

【解決手段】 ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ (E 1) と加水分解酵素 (E 2) とを併用し、下記反応式 (I) により 2-アミノ-6-置換プリン (2-AP) と 2'-デオキシヌクレオシド (d R-B) から 2'-デオキシグアノシン (d R-G u a) を合成することを特徴とする 2'-デオキシグアノシンの製造法に関するものである。

【式 1】



(I)

(式中、2APは2-アミノ-6-置換プリン、d Rは2-デオキシリボース、G u aはグアニン、Bは核酸塩基、E 1はヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ、E 2は加水分解酵素を示す。)

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-212348
受付番号	50201071376
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 7月23日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 7月22日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006770]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
氏 名 ヤマサ醤油株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.